УДК: 616.61-002-053.3/.5+575.191

Крючко Т.О., Остапенко В.П., Кушнерева Т.В.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», Україна, м. Полтава.

Клініко-генетичні аспекти хронічного пієлонефриту у дітей: структура схильності та первинний прогноз.

Питання вивчення факторів ризику, особливостей клініки та ранньої діагностики інфекційно-запальних захворювань сечової системи у дітей для педіатрів мають особливе значення у зв'язку з їх високою поширеністю і не завжди благоприємним прогнозом. За останні роки відзначається зростання питомої ваги інфекцій сечової системи в загальній структурі захворюваності у дітей з 18 на 1000 до 36-100 на 1000 дитячого населення [1,3,7]. У переважної більшості дітей запалення призводить до незворотніх пошкоджень паренхіми нирок із заміщенням ушкоджених ділянок сполучною тканиною, що в подальшому призводить до розвитку хронічної ниркової недостатності (ХНН) і артеріальної гіпертензії [2,5,6,7]. Хоча багато факторів, що призводять до розвитку пієлонефриту (ПН), загальновідомі (обструкція, дисметаболічні порушення, спадковість тощо), тим не менш, у 41% дітей склерозування розвивається при відсутності порушень уродинаміки, тобто безпосередньою причиною ниркового пошкодження у дітей є інфекція, яка супроводжується місцевою активацією і запуском цитотоксичного метаболізму [10,17,18]. Тому, на сьогоднішній день для вдосконалення медичної допомоги дітям із інвалідизуючими хронічними захворюваннями, надзвичайно важливі дослідження спрямовані на вивчення факторів ризику їх розвитку та прогресування.

Спектр мікроорганізмів, які викликають інфекції сечовивідних шляхів та нирок різноманітний та залежить від віку, статі, шляхів розповсюдження та форми перебігу захворювання. В останній час в ґенезі інфекцій сечових шляхів у дітей велика увага приділяється ролі внутрішньоклітинних збудників, а саме Chlamidia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis. [4,5,7,14]. Встановлено, що саме ці збудники відіграють провідну роль в розвитку рецидивуючого перебігу інфекцій сечової системи, та при цьому часто протікають як мікст-інфекції з бактеріальною флорою [8,9,13].

У зв'язку зі змінами, що відбуваються за останнє десятиліття в етіологічній структурі збудників пієлонефриту у дітей та розвитком стійкості мікробної флори до раніше широко застосовуваних хіміопрепаратів, дуже актуальними є дослідження регіональних особливостей етіології збудників, оскільки успіх лікування і прогноз пієлонефриту багато в чому залежать від правильно підібраної і вчасно розпочатої антибактеріальної терапії, яка

практично завжди починається з емпіричного призначення антибактеріальних препаратів [12,14,17,18] .

Слід зауважити, що окрім характеристики збудника, розвиток та перебіг ПН визначається індивідуальними властивостями макроорганізму – господаря (насамперед давати адекватну імунну відповідь), що є відображенням його генетичної структури. Тому одним із сучасних підходів у попередженні розвитку будь-якої патології є генетичне прогнозування ризику її формування. Це стало можливим тільки в останні роки, коли стартували біомедичні дослідження, спрямовані на розробку методів детекції молекулярних особливостей формування мультифакторних захворювань. На сьогоднішній день відкривається все більше факторів, які свідчать про генетичну схильність до розвитку багатьох ниркових захворювань [7,8,17, 18, 19].

Імунологічний захист проти різних патогенів здійснюється в результаті скоординованої роботи вродженої (неспецифічної) і адаптивної (специфічної) систем імунітету, взаємодія яких забезпечує ефективне протікання імунної відповіді. [15,18]. Розпізнавання чужорідних для організму молекулярних структур мікробного походження відомих як патогенасоційовані молекулярні паттерни (pathogen associated molecular patterns – PAMPs) здійснюється за допомогою так званих паттернрозпізнаваючих рецепторів (ПРР) [2]. В результаті структурних досліджень до групи ПРР були віднесені і Toll-подібні рецептори (TLR). У людини Toll-подібні рецептори являють собою сімейство молекул, яке налічує 13 індивідуальних рецепторів (на даний час добре охарактеризовані 11 із них), які здатні розпізнавати практично всі основні типи патогенів, у тому числі і різні типи бактерій, віруси, гриби, найпростіші та паразити [14].

На сьогоднішній день роль Toll-подібних рецепторів у розвитку багатьох інфекцій залишається не з’ясованою і потребує детального вивчення. Дефекти в системі Toll-подібних рецепторів, такі, як порушення розпізнавання лігандів, експресії TLR, трансдукції сигналу, синтез ефекторних молекул, а також поліморфізм генів Toll-подібних рецепторів можуть призводити до розвитку важких інфекційних, аутоімунних захворювань, атеросклерозу, алергопатології тощо [14,15,16]. Нашу увагу привернув поліморфізм TLR4 Asp299Gly, адже існує ряд досліджень, які свідчать про те, що наявність саме цих мутантних алелей генів, підвищують ризик зараження урогенітальними інфекціями, такими як хламідіоз, мікоплазмоз, уреоплазмоз, гарднельоз, трихомоніаз [8,9]. Поліморфізм генів припускає, що з одного і того ж гена може бути скопійовано кілька структурно відрізняючихся копій одного й того ж білка, при цьому частина скопійованих варіантів або не володіє активністю, або може мати протилежну функцію. Оскільки відмінності в генах, що контролюють захисні

реакції організму, можуть визначати різний характер перебігу запальної відповіді та специфічних імунологічних реакцій при впровадженні чужорідних агентів, вивчення поширеності однонуклеотидних замін у дітей з хронічним ПН становить особливий інтерес [15,16].

Мета нашого дослідження: з сучасних позицій оцінити значимість поліморфізму Asp299Gly Toll-подібного рецептора 4 у реалізації схильності до хронічного пієлонефриту в дитячому віці та проаналізувати його асоціації із основними збудниками інфекцій сечової системи.

Об'єкти та методи дослідження. Проведено клініко-лабораторне обстеження 53 дітей хворих на хронічний пієлонефрит під час загострення, які знаходились на стаціонарному лікуванні у педіатричному відділенні №2 (нефрологічні ліжка) дитячої обласної клінічної лікарні м. Полтави.

Відбір біологічних зразків від хворих, за якими спостерігали, проводився за умови відсутності інфекційних захворювань. Матеріалом для дослідження була периферична венозна кров, забір якої проводився із кубітальної вени в стерильні вакутайнери із стабілізатором (ДТА) з наступним внесенням її в епендорфи з реактивом «Днк-експрес». Генотипування поліморфної ділянки Asp299Gly проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технология», Москва).

Поліморфну ділянку Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 ампліфікували за допомогою ПЛР в 25 мкл реакційної суміші, в яку входило: 2,5 мкл 10 х Buf для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag; 20-50 нг. геномної ДНК; по 66 нг праймерів для Asp299Gly.

Бактеріологічне дослідження сечі із встановленням мікробного збудника та його чутливості до антибактеріальних і хіміотерапевтичних засобів, а також молекулярно-біологічне дослідження (полімеразна ланцюгова реакція для визначення Chlamidia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, матеріал дослідження – зішкріб епітеліальник клітин із уретри) у більшості хворих здійснювали до призначення антибактеріальної терапії.

Групу контролю склали 95 практично здорових осіб із бази генетичних зразків НДІ Генетичних та імунних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «УМСА». Від усіх пацієнтів була отримана добровільна письмова згода на участь у науковому досліджені,

яке проводилось із дозволу комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми «STATISTICA for Windows 7.0» (StatSoft Inc) і електронних таблиць MS Excel. Розподіл генотипів по досліджуваним поліморфним локусам перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2. Для порівняння частот алелей між групами, які досліджувались, використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Ієйтса на безперервність при числі ступенів свободи, який рівний 1. Порівняння частот генотипів між групами, які досліджуються, проводили шляхом аналізу таблиць спряження за допомогою точного теста Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірливого інтервалу (ДІ). Для усіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p<0,05$, при $0,05<p\leq0,1$ відмічали тенденцію до відмінності.

Отримані результати.

Проведений аналіз розподілу частот генотипів по досліджуваному гену TLR4 Asp299Gly в групах спостереження наведений в таблиці 1.

Таблиця 1. Розподіл частот генотипів поліморфізму гену TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб та дітей хворих на ПН, % (n)

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю, n=95	Хворі діти на хронічний ПН, n=53
TLR4 Asp299Gly	AA	91,6% (87)	84,9% (45)
	AG	8,4% (8)	13,2% (7)
	GG	0%(0)	1,9% (1) *

- *p<0,05 у порівнянні з групою осіб полтавського регіону*

Як видно із таблиці, «дикий тип» генотипу TLR4 зустрічався у 91,6% здорових осіб, частота гетерозиготного генотипу склала 8,4%, мутантного GG – 0,0%. В той час, як у дітей хворих на хронічний пієлонефрит частота генотипів AG і GG майже у 2 рази перевищувала показники групу контролю (AG - 13,2% та GG - 1,9%), що відповідало теоретично очікуваному по рівновазі Харді-Вайнберга. Тобто група хворих осіб наближується до вимог ідеальної популяції, еволюційні зміни якої відбуваються шляхом зміни генофонду загальної сукупності генів кожної такої популяції.

Вивчення поширеності нормальної і мутантної алелі 299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 у обстежуваних групах (таблиця 2) показало, що мутантний алель Gly практично в 2 рази частіше виявлявся у дітей із хронічним пієлонефритом (8,4%) у порівняні з групою контролю (4,21%) (*p<0,05*).

Таблиця2. Розподіл частот алелей поліморфізму гену TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб та дітей хворих на хронічний ПН, % (n)

Ген, поліморфізм	Алель	Група контролю, n=95	Хворі діти на хронічний ПН, n=53
TLR4 Asp299Gly	A	95,79% (182)	91,5% (97)
	G	4,21% (8)	8,4% (9)*

**p<0,05 у порівнянні з групою здорових осіб полтавського регіону*

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання в цілому або бути асоційованими із конкретними етіопатогенетично значимими ознаками. Тому, в рамках нашої роботи важливим етапом став аналіз асоціації поліморфізму гена TLR4 із основними збудниками інфекцій сечової системи у дітей з хронічним пієлонефритом. Для вирішення поставленої задачі ми сформували дві підгрупи дітей: перша – хворі із гетерозиготним та гомозиготним за мутантним алелем генотипом (Asp/Gly, Gly/Gly), а в групу порівняння ввійшли діти з хронічним пієлонефритом із нормальним розподілом алелей. Аналізуючи параметри захворювання ми виявили вірогідні відмінності серед хворих із різними варіантами генотипів (таблиця №3).

Результати молекулярно-біологічного обстеження хворих на хронічний пієлонефрит дітей, свідчать, що частота виявлення мікоплазменної інфекції у дітей першої підгрупи більше ніж в 4 рази перевищувала показники групи порівняння (87,5% та 20% відповідно). Ureaplazma ureolyticum також, в 3 рази частіше реєструвалася у дітей із мутантним алелем генотипом на противагу дітей з нормальним розподілом алелей (37,5% та 12,5% відповідно). Внутрішньоклітинні збудники у переважної більшості дітей обох підгруп виявлялися у вигляді моноінфекції (62,5% та 92,5% відповідно), а визначення асоціацій декількох збудників достовірно частіше реєструвалося у дітей першої підгрупи на противагу дітей із нормальним розподілом алелей (37,5% та 7,5% відповідно).

Таблиця 3. Аналіз асоціації генотипів TLR4 із основними етіологічними збудниками хронічного пієлонефриту у генетично обстежених дітей n (%)

Етіологічний чинник	Хворі з мутантним алелем генотипом (Asp299Gly, Gly299Gl), n=8		Діти із нормальним розподілом алелей (Asp299Asp), n=40	
	Абс.	Віднос., %	Абс.	Віднос., %
Chlamidia trachomatis	1	12,5	4	10,0
Ureaplazma ureolyticum	3	37,5*	5	12,5
Mycoplazma hominis	7	87,5*	8	20
Внутрішньоклітинні збудники не виявлені	0	0	26	65
Виявлені асоціації внутрішньоклітинних збудників	3	37,5*	3	7,5
Кишкова паличка	1	12,5	9	22,5
Протей	0	0	1	2,5
Клебсієла	1	12,5	1	2,5
Ентеробактерії	0	0	2	5,0
Мікробні ассоціації	0	0	2	5,0
Мікст-інфекція	1	12,5*	1	2,5
Флора не виділена	6	75,0	27	67,5

**p<0,05 у порівнянні з контрольною группою*

Результати бактеріального обстеження хворих на хронічний пієлонефрит дітей, свідчать, що у переважної більшості дітей обох підгруп бактеріальну флору не визначали (75,0% та 67,5% відповідно). Можливими причинами отримання негативних результатів бактеріологічного дослідження, на наш погляд, були: початок проведення антибактеріальної терапії в амбулаторних умовах, до направлення у стаціонар. Серед бактеріальних збудників у дітей першої підгрупи в рівній значимості були зафіксовані кишкова паличка та клебсієла, на противагу хворих дітей із нормальним розподілом алелей, де домінувала кишкова паличка та ентеробактерії, а клебсієла і протей були зареєстровані в одиничних випадках.

Висновки: Таким чином, отримані дані засвідчують, що гетерозиготний та гомозиготний за мутантним алелем генотипи можуть розглядатися як предиктори підвищеного ризику реалізації хронічного пієлонефриту, який асоціюється із формуванням фенотипових проявів захворювання, з переважанням рецидивуючого і торпідного перебігу запальних змін, та необхідністю проведення тривалої підтримуючої уросептичної терапії.

Вивчивши генотипічні особливості хронічного пієлонефриту у дітей з поліморфізмом гена Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) визначено, що гетерозиготний та гомозиготний за мутантним алелем генотипи асоціюються із підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (Mycoplazma hominis, Ureaplazma ureolyticum) ПН, що дозволяє розглядати поліморфізм гена Toll-подібного рецептора 4 в якості додаткового прогностичного показника в генетичних дослідженнях.

Тому, індивідуальний підхід до пацієнта, заснований на науковій інтерпретації результатів генетичного дослідження, їх зіставлення з даними клінічних, лабораторних та інструментальних методів, дозволяє здійснити ранню діагностику генетично детермінованих захворювань і запропонувати максимально ефективну схему профілактичних і лікувальних заходів для попередження прогресування патологічного процесу.

Література:

1. Особенносги терапии пиелонефрита у детей на современном этапе // Вопросы современной педиатрии. - 2003. -Т.2, прил.№1. - С.317.
2. Игнатова М.С., Харина Е.А., Длин В.В. Решенные и нерешенные проблемы эконефрологии детского возраста. // Педиатрия. 1997. - №6. - С.54-57.
3. Мальченко Л.А., Петрушина А.Д., Моргунова СЛ. Состояние иммунной системы при различных формах микробно-воспалительных заболеваний мочевой системы у детей. // II съезд педиатров-нефрологов России. / Материалы съезда. М., 2000. - С.34.
4. Катосова JI.К. Микрофлора мочи у детей с хроническим обструктивным пиелонефритом. // Автореф. дис. . канд.мед.наук. Оренбург, 1993. - 24 с.
5. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов. // Инфекции и антимикробная терапия. -2003. Т.5, №2. - С.48-55.
6. Кириллов В.И., Теблоева Л.Т. Перспективный подход к лечению хронического обструктивного пиелонефрита, как иммунопатологии. // II съезд педиатров-нефрологов России. / Материалы съезда. М., 2000. - С.35-36.

7. Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій // Цитология и генетика . — 2011. — 45, N 4. — С. 29-35.
8. Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. Роль поліморфізму TLR4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом // Проблеми екології та медицини . — 2009. – Т.13, №5. - С.3-6.
9. Haier J., Nasralla M., Franco A.R., Nicolson G.L. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. // Rheumatology. 1999. -Vol.38, №6. - p.504-509.
10. Zdrodowska-Stefanow B., Darewicz B., Ostaszewska I., Pucilo K. The role of Chlamydia trachomatis infections in women with urinary tract diseases. // Pol. Merkuriusz. Lek. 1997. - Vol.2, №10. - p.270-272.
11. White C.T., Matsell D.G. Children's UTIs in the new millennium. Diagnosis, investigation, and treatment of childhood urinary tract infections in the year 2001. // Can. Fam. Physician. 2001. - Vol.47. - P. 1603-1608.
12. Benador D., Benador N., Slosman D. Mermillod B., Girardin E. Are younger children at highest risk of renal sequelae after pyelonephritis? // Lancet. -1997. -Vol.349. P. 17-19.
13. Centers of Disease Control and Prevention: Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. //MMWR. 2002. - Vol.51, №6. - P. 1-77.
14. Krishnan J. Toll-like receptor signal transduction / J. Krishnan, K. Selvarajoo, M. Tsuchiya, G. Lee, S. Choi // Exp Mol Med. – 2007. - 39:421-38.
15. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B.Ferwerda, M.BB. McCall, K. Verheijen, B.J. Kullberg // MOL MED 14 (5-6). – 2008. - P. 346-352.
16. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with Gram–negative septic shock. J. Infect. Immun. 2000; 68: 6398–6401.
17. Bergstrom T. Sex differences in childhood urinary tract infection. // Archives of Disease in Childhood. 1972;47(252):227-32. 4554084.
18. Lomberg H., Hanson L.A., Jacobson B., Jodal U., Leffler H., Svanborg-Eden C. Correlation of P blood group, vesicoureteral reflux, and bacterial attachment in patients with recurrent pyelonephritis. // N. Engl. J. Med. 1983. - Vol.308. - P.l 1891192.

Резюме. В даний час вивчення механізмів розпізнавання чужорідних агентів, яка реалізується за допомогою Toll-подібних рецепторів природженої імунної системи стала однією з головних задач клінічної імунології. Метою нашого дослідження був аналіз асоціації між поліморфізмом гена Toll-подібного рецептора 4 (Asp299Gly) із основними

збудниками інфекцій сечової системи. Отримані результати підтверджують важливу роль Toll-подібних рецепторів у реалізації вродженого імунної відповіді і дозволяють розглядати поліморфізм гена Toll-подібного рецептора 4 в якості додаткового прогностичного показника в генетичних дослідженнях.
Ключові слова: вроджений імунітет, поліморфізм, Toll-подібні рецептори, бактеріальні інфекції, внутрішньоклітинні збудники.

Summary. Currently studying the mechanisms of recognition of foreign agents, which is implemented by Toll-like receptor innate immune system has become one of the main tasks of clinical immunology. The aim of our study was an analysis the association between gene polymorphism Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) with the main pathogens of the infections urinary system. These results confirm the important role of Toll-like receptors in the realization of an innate immune response and allow considering polymorphism Toll-like receptor 4 as an additional prognostic indicator in genetic researches.
Key words: innate immunity, polymorphism, Toll-like receptors, bacterial infection, intracellular pathogens.